

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平4-46120

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 31/395

識別記号

ABC  
ABE  
ABL

庁内整理番号

7475-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)2月17日

C 12 P 17/18  
// C 07 D 227/12

8931-4B  
6701-4C

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 血管新生抑制剤

⑮ 特 願 平2-152099

⑯ 出 願 平2(1990)6月11日

⑰ 発 明 者 佐 野 浩 東京都町田市玉川学園7-19-16

⑱ 発 明 者 玉 沖 達 也 東京都町田市本町田2662-13

⑲ 発 明 者 大 村 智 東京都世田谷区瀬田5-12-7

⑳ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

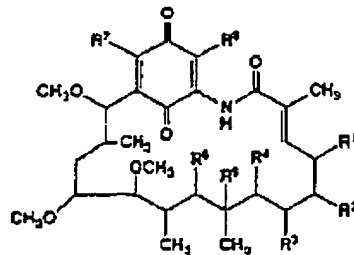
明 細 書

1. 発明の名称

血管新生抑制剤

2. 特許請求の範囲

一般式(1)



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は「 $\text{H}$ 」または「 $\text{H}$ 」と一緒になって結合を成し、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が「 $\text{H}$ 」の場合、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>はそれぞれ一緒になって結合を成し、R<sup>1</sup>およびR<sup>3</sup>は「 $\text{H}$ 」を成す。R<sup>1</sup>およびR<sup>3</sup>が一緒になって結合を成す場合、R<sup>2</sup>はOCH<sub>3</sub>または「 $\text{H}$ 」を成し、R<sup>2</sup>は「 $\text{H}$ 」または「 $\text{NH}$ 」を成し、R<sup>5</sup>は「 $\text{H}$ 」またはBrを成し、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>は、R<sup>6</sup>がOCONH<sub>2</sub>、の

場合R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は一緒になって「 $\text{O}$ 」または結合を成し、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>が一緒になって「 $\text{O-CO-O}$ 」を成す場合、R<sup>8</sup>はBrを成す。)で表わされるハービファイシン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、血管新生抑制剤に関する。血管新生抑制剤は、血管の異常増殖によって発症する疾患、たとえばリウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人性黄斑変性症、創傷治癒時の過剰瘢痕形成の予防または治療薬として期待される。

従来の技術

血管新生抑制作用を有する物質としては、たとえばノドロキシプロゲステロン、硫酸化多糖体、牛胎骨抽出液などが知られており、またコルチゾンとヘパリンの併用によって、血管新生を抑制することができることも知られている。

ハービファイシンはアンチファイン系抗生物質に分類される抗生物質で除菌活性、抗タバコモザイクウイルス活性およびP388ロイケミア、R16

メラノーマ、L1210 ロイケミア、ルイス・ラング・カルシノーマ、エーリッヒ・アサイテス・カルシノーマなどを用いたマウス実験動物系において抗癌活性を示すことが知られている。ある種のハービマイシンの誘導体がエーリッヒ・アサイテス・カルシノーマを用いたマウス実験動物系において抗癌活性を有することが知られている〔ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics) 37, 1264 (1984) ; 39, 415 (1986)〕。

また、ハービマイシン A およびその誘導体が癌化した細胞を正常の細胞に分化させることが知られている〔モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 6, 2198 (1986), ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics), 41, 831 (1988)〕。

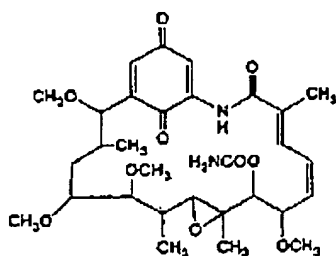
#### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤を提供することにある。

を提供する。

以下に、化合物 (1) の具体例およびそれぞれの物理化学的性質を示す。

#### (1) 化合物 1-1



TLC Rf値: 0.5 (ベンゼン: 酢酸エチル=1:1)

融点: 138℃

屈光度:  $(\alpha)_D^{25} = +126.0^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CHCl_3} = 272(23,900)$

マススペクトル: m/z 530 (M<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

水素核磁気共鳴スペクトル (CDCl<sub>3</sub>, 中):  $\delta$  (ppm)

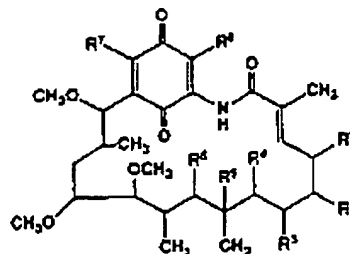
5.98 (1H, dd, J=1.0, 11.5 Hz), 6.59 (1H, dd,

J=2.0, 2.0 Hz), 6.46 (1H, dd, J=11.5, 12.5 Hz),

5.80 (1H, dd, J=11.5, 11.5 Hz), 4.56 (1H, d, J=

#### 課題を解決するための手段

本発明によれば、一般式 (1)

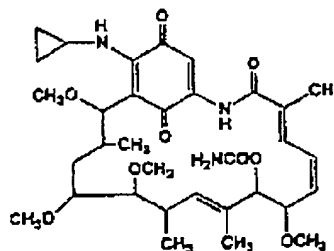


(式中、R'およびR'はCまたは一輪になって結合を成し、R'およびR'がCの場合、R'とR'およびR'とR'はそれぞれ一輪になって結合を成し、R'およびR'はHを成す。R'およびR'が一輪になって結合を成す場合、R'はOCH<sub>3</sub>またはCを成し、R'はHまたはNH-を成し、R'はHまたはBrを成し、R', R'およびR'は、R'がOCONH<sub>2</sub>の場合R'およびR'は一輪になって-C-または結合を成し、R'およびR'が一輪になって-CO-O-を成す場合、R'はBrを成す。) で表されるハービマイシン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤

1) 5Hz), 4.17 (1H, s), 2.95 (1H, d, J=9.0 Hz),

1.33 (3H, t)

#### (2) 化合物 1-2



TLC Rf値: 0.60 (ベンゼン: 酢酸エチル=1:1)

旋光度:  $(\alpha)_D^{25} = -138.0^\circ$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CHCl_3} = 245(32,000)$

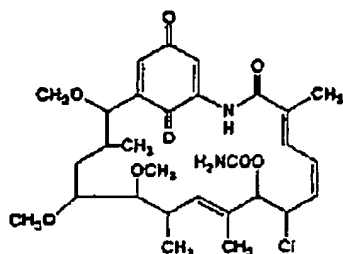
マススペクトル: m/z 629 (M<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

水素核磁気共鳴スペクトル (CDCl<sub>3</sub>, 中):  $\delta$  (ppm)

7.60 (1H, brd), 6.48 (1H, s), 4.48 (1H, brd)

特開平 4-46120 (3)

(3) 化合物 I-3



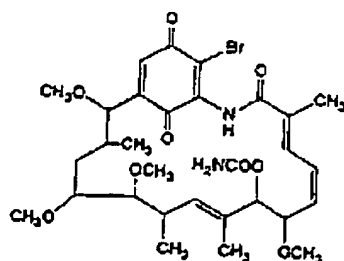
TLC Rf値: 0.63 (ベンゼン: アセトン=7:3)  
融点: 128℃ (分解)  
旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +54^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)  
紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CHCl_3}$  nm(ε) 232(18,500)  
高分解能マススペクトル: m/z 578, 239

(C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>としての計算値 578.239)  
水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):  
δ(ppm) 7.23(1H, d, J=2.3Hz), 6.60(1H, dd, J=2.3, 3.0Hz), 5.99(1H, dd, J=7.61, 1.6Hz), 5.80(1H, brs), 5.51(1H, ud, J=1.0, 7.1Hz), 5.10(1H, brd, J=7.6Hz), 4.50(1H, d, J=3.0Hz), 1.66(3H, d, J=1.1Hz)

J=2.7, 10.6Hz), 4.66(1H, dd, J=2.7, 9.8Hz), 3.75(3H, d, J=1.3Hz)

元素分析: C 60.26, H 6.98, N 2.45, Cl 12.89  
C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>としての計算値:  
C 60.74, H 6.74, N 2.53, Cl 12.64

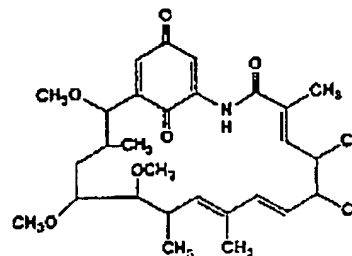
(5) 化合物 I-5



TLC Rf値: 0.45 (ベンゼン: アセトン=7:3)  
融点: 178℃ (分解)  
旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +93^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)  
紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CHCl_3}$  nm(ε) 258(18,600)  
水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):  
δ(ppm) 6.92(1H, d, J=0.9Hz), 6.42(1H, ud, J=1.1, 11.5Hz), 6.32(1H, dd, J=11.5,

元素分析: C 60.01, H 6.92, N 4.71, Cl 5.89  
C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>としての計算値:  
C 60.18, H 6.80, N 4.84, Cl 6.05

(4) 化合物 I-4

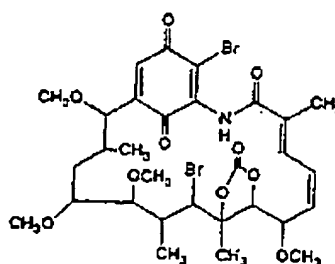


TLC Rf値: 0.89 (ベンゼン: アセトン=7:3)  
融点: 199℃ (分解)  
旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +99^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)  
紫外線吸収スペクトル:  $\lambda_{max}^{CHCl_3}$  nm(ε) 271(23,500)  
高分解能マススペクトル: m/z 553, 200

(C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>としての計算値 553.200)  
水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub>中):  
δ(ppm) 7.33(1H, d, J=2.5Hz), 6.53(1H, dd, J=2.7, 2.5Hz), 6.55(1H, d, J=13.5Hz), 5.86(1H, dd, J=9.8, 13.5Hz), 4.99(1H, dd, 12.5Hz), 5.30(1H, dd, J=10.6, 11.5Hz), 5.28(1H, ud, J=1.0, 7.8Hz), 5.03(1H, d, J=9.4Hz), 4.49(1H, dd, J=6.9Hz), 4.00(1H, dd, J=9.1, 10.6Hz), 3.18(1H, dd, J=1.1, 10.0Hz), 2.25(1H, m), 1.26(3H, d, J=1.0Hz)

元素分析: C 54.89, H 6.32, N 4.26, Br 12.68  
C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>8</sub>としての計算値:  
C 55.20, H 6.34, N 4.29, Br 12.10

(6) 化合物 I-6



TLC Rf値: 0.84 (ベンゼン: アセトン=7:3)  
融点: 132℃ (分解)  
旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +83^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル :  $\lambda_{max}^{H_2O}$  nm (ε) 263 (12,000)

赤外線吸収共鳴スペクトル (COC 2.0 中) :

$\delta$  (ppm) 7.28 (1H, qd,  $J=1.2, 12.2$  Hz), 6.81 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 4.61 (1H, d,  $J=2.3$  Hz), 4.47 (1H, s), 4.32 (1H, d,  $J=9.4$  Hz), 2.32 (1H, m), 1.83 (3H, s)

元素分析 : C 48.97, H 5.31, N 1.93, Br 23.69

$C_{10}H_{12}BrNO_2$  としての計算値 :

C 49.24, H 5.38, N 1.92, Br 21.16

化合物 1-1 および 1-2 は特開昭 63-218620

号公報に、化合物 1-3 から 1-6 はジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (J Antibiotics), 39, 415 (1986) にそれぞれ製造法とともに記載されている公知物質である。

化合物 (1) は投与の目的および方法により、常法により調製された錠剤、顆粒剤、粉剤、カプセル剤、シロップ剤、軟膏剤、クリーム剤、注射剤などの形で投与することができる。とくに注射剤の形で用いるのが好ましい。注射剤として用いる場合、生理食塩水、ブドウ糖、ラクトース、マ

ンニット注射剤に適切な界面活性剤たとえば Tween® 80 を助剤として加えそこへ化合物 (1) を懸濁させ、これを 1~1000 mg/kg、1 日 1~3 回で静脈内あるいは局所に投与する。

化合物 (1) は血管新生作用を有し、ハービマインシン A と比較して低毒性である。また化合物の一部はハービマインシン A が示すような既存の血管に対する作用がないことから、血管の異常発達によって発症する様々な疾患たとえば、リュウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人性黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成などに有用である。次に化合物 (1) の毒性および薬理作用について、試験例で説明する。

#### 試験例 1

##### 急性毒性試験

6 週齢、雄の DDY マウス ( $25 \pm 1$  g、1 群 3 匹) に、2% のアラビアガムを含む生理食塩水に懸濁した試験化合物を腹腔内に投与し、24 時間後の生存率から 50% 生存投与量 ( $LD_{50}$ ) を上げ下げ法で算出した結果、化合物 (1) はいず

れも  $LD_{50} > 2000$  mg/kg であった。

#### 試験例 2

鶏受精卵の鶏尿膜内の血管新生に対する抑制作用

エヌ・タナカらの方法 [Experimental Pathology, 30, 141 (1986)] に従い、鶏受精卵の鶏尿膜内の血管新生に対する化合物 (1) の作用を調べた。

10~20 歳の 4.5 日齢の鶏の受精卵に小穴を開け、後尿膜上に酢酸ビニルエチレン共重合体 (FV40 : 三井・デュポン社製) に封入した試験化合物を設置し、37℃ で 2 日間孵卵器内で培養後、10% のブドウ糖液 [イントラリポス (intralipos) : ミドリ十字社製] 1 ml を鶏尿膜内に注入し、鶏尿膜内に新生される血管に対する試験化合物の抑制作用の程度を観察した。

すなわち、血管形成の認められない領域が 3 mm 以上の卵卵を完全抑制を示した鶏卵とし、抑制率を次式で算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{完全抑制を示した鶏卵の数 (個)}}{\text{全鶏卵数 (個)}} \times 100$$

またフィッシャー (Fischer) の正確確立法により p 値を求めた。いずれのデータも p 値は 0.05 以下であった。

その結果を第 1 表に示す。第 1 表に示したように、本発明の化合物は、0.01~10 mg/個の投与で、有意な血管新生抑制作用が認められた。

#### 試験例 3

##### 既存の血管に対する作用試験

10 日目の鶏卵を用いて試験例 2 と同様にして試験化合物を設置、培養し、鶏尿膜内にすでに形成されている血管に対する作用を調べた。既存の血管の消失が観察されるものを、変化がないものをとして第 1 表に示す。

第 1 表

化合物	投与量 (mg/個)	抑制率 (%)	既存血管に 対する作用
I-1	0.1	12	+
	1	100	
	10	100	
I-2	0.01	20	+
	0.1	50	
	1	80	
	10	100	
I-3	0.1	12	+
	1	50	
	10	100	
I-4	0.1	12	+
	1	65	
	10	100	
I-5	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	35	
	10	30	
I-6	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	30	
	10	30	
ハートマイ シンA	0.01	0	+
	0.1	50	
	1	100	

以下に本発明を実施例で示す。

## 実施例 止血剤

化合物(I-1)の200gをエタノール20Lに溶解した後、ミリポアフィルター(孔径0.22μ)で加圧ろ過して無菌化をこなう。得られる無菌ろ液5.0mlを褐色バイアルに分注し、常圧により凍結乾燥し、50mg/バイアルの凍結乾燥剤を得る。

## 発明の効果

本発明により、医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤が提供される。

特許出願人(102) 協和薬研工業株式会社

代表者 加藤 修 夫

